



IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

In re Application of: Gunji et al.	
	Art Unit: 1621
Application No.: 10/716,480	Examiner: [to be assigned]
Filing Date: November 20, 2003	Atty. Docket: US-102
Title: Method for producing L-amino acid using methylotroph	

CLAIM FOR PRIORITY UNDER 35 U.S.C. § 119 IN UTILITY APPLICATION

Commissioner of Patents
P.O. Box 1450
Alexandria, VA 22313-1450


Sir:

Priority under 35 U.S.C. § 119 is hereby claimed to the following priority document(s), filed in a foreign country within one (1) year prior to the filing of the above-referenced United States utility patent application (35 U.S.C. § 172):

Country	Priority Document Appl. No.	Filing Date
Japan	2002-336315	November 20, 2002

A certified copy of each listed priority document is submitted herewith. Prompt acknowledgment of this claim and submission is respectfully requested.

Respectfully submitted,


Shelly Guest Cermak
Reg. No. 39,571

Date: April 2, 2004
PTO Customer Number: **000038108**
Ajinomoto Corporate Services, LLC
1120 Connecticut Avenue
Ste. 1010
Washington, D.C. 20036
202.457.0284

日本国特許庁
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日 2002年11月20日
Date of Application:

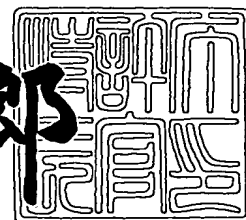
出願番号 特願2002-336315
Application Number:
[ST. 10/C]: [JP 2002-336315]

出願人 味の素株式会社
Applicant(s):

2003年 7月10日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

太田信一郎



出証番号 出証特2003-3056294

【書類名】 特許願

【整理番号】 P-B0245

【提出日】 平成14年11月20日

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 C12N 15/00
C12P 13/06

【発明の名称】 メチロトロフを用いたL-アミノ酸の製造法

【請求項の数】 9

【発明者】

 【住所又は居所】 神奈川県川崎市川崎区鈴木町 1-1 味の素株式会社内

 【氏名】 郡司 義哉

【発明者】

 【住所又は居所】 神奈川県川崎市川崎区鈴木町 1-1 味の素株式会社内

 【氏名】 安枝 寿

【特許出願人】

 【識別番号】 000000066

 【氏名又は名称】 味の素株式会社

【代理人】

 【識別番号】 100089244

 【弁理士】

 【氏名又は名称】 遠山 勉

【選任した代理人】

 【識別番号】 100090516

 【弁理士】

 【氏名又は名称】 松倉 秀実

【選任した代理人】

【識別番号】 100100549

【弁理士】

【氏名又は名称】 川口 嘉之

【連絡先】 0 3 - 3 6 6 9 - 6 5 7 1

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 012092

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 メチロトロフを用いた L-アミノ酸の製造法

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 コリネ型細菌の L y s E タンパク質又はその相同タンパク質の変異体をコードする DNA であって、同変異体は、メタノール資化性菌に導入したときに、同細菌に L-リジンアナログに対する耐性を付与する活性を有することを特徴とする DNA。

【請求項 2】 前記変異体が、下記 (A) または (B) に示すタンパク質である請求項 1 に記載の DNA。

(A) 配列番号 2 に記載のアミノ酸配列を有し、かつ、少なくとも 56 位のグリシン残基が他のアミノ酸残基に置換されたタンパク質。

(B) 配列番号 2 に記載のアミノ酸配列において、少なくとも 56 位のグリシン残基が他のアミノ酸残基に置換され、かつ、56 位以外の位置において 1 若しくは数個のアミノ酸残基の置換、欠失、挿入又は付加を含むアミノ酸配列を有し、かつ、メタノール資化性菌に導入したときに、同細菌に L-リジンアナログに対する耐性を付与する活性を有するタンパク質。

【請求項 3】 下記 (a) 又は (b) に示す DNA である請求項 2 に記載の DNA。

(a) 配列番号 1 に記載の塩基配列を有し、かつ、コードされるタンパク質の 56 位のグリシン残基が他のアミノ酸残基に置換される変異を有する DNA。

(b) 配列番号 1 に記載の塩基配列又は同塩基配列から調製され得るプローブとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ、メタノール資化性菌に導入したときに、同細菌に L-リジンアナログに対する耐性を付与する活性を有する DNA。

【請求項 4】 前記他のアミノ酸残基がセリン残基である請求項 2 又は 3 に記載の DNA。

【請求項 5】 前記 L-リジンアナログが S-(2-アミノエチル)-システインである請求項 1~4 のいずれか一項に記載の DNA。

【請求項 6】 前記メタノール資化性菌がメチロフィラス属細菌又はメチロ

バチラス属細菌である請求項 1～5 のいずれか一項に記載の DNA。

【請求項 7】 メチロフィラス属又はメチロバチルス属に属し、請求項 1～6 のいずれか一項に記載の DNA が、発現可能な形態で導入され、かつ、L-リジン又は L-アルギニン生産能を有する細菌。

【請求項 8】 請求項 7 に記載の細菌を培地に培養し、該培養物中に L-リジン又は L-アルギニンを生産蓄積させ、該培養物から L-リジン又は L-アルギニンを採取することを特徴とする L-リジン又は L-アルギニンの製造法。

【請求項 9】 前記培地がメタノールを主たる炭素源とすることを特徴とする請求項 8 に記載の L-リジン又は L-アルギニンの製造法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は微生物工業に関連したものであり、詳しくは、発酵法による L-リジン又は L-アルギニンの製造法、および同製造法に用いる微生物に関するものである。

【0002】

【従来の技術】

L-リジン、L-グルタミン酸、L-スレオニン、L-ロイシン、L-イロソイシン、L-バリン及び L-フェニルアラニン等の L-アミノ酸は、ブレヴィバクテリウム属、コリネバクテリウム属、バチルス属、エシェリヒア属、ストレプトミセス属、シュードモナス属、アースロバクター属、セラチア属、ペニシリウム属、キャンディダ属等に属する微生物を用いた発酵法により工業生産されている。これらの微生物は、生産性を向上させるために、自然界から分離した菌株または該菌株の人工変異株が用いられている。また、組換え DNA 技術により L-アミノ酸の生合成酵素を増強することによって、L-アミノ酸の生産能を増加させる種々の技術が開示されている。

【0003】

上記のような微生物育種や製造法の改良により、L-アミノ酸の生産性はかなり高まってはいるが、今後の需要のいっそうの拡大に応えるためには、さらに安

価かつ効率的なL-アミノ酸の製造法の開発が求められている。

【0004】

ところで、従来、安価に大量に入手可能な発酵原料であるメタノールから発酵法によりL-アミノ酸を製造する方法としては、アクロモバクター属およびシュードモナス属（特許文献1）、プロタミノバクター属（特許文献2）、プロタミノバクター属及びメタノモナス属（特許文献3）、マイクロサイクラス属（特許文献4）、メチロバチルス属（特許文献5）、バチルス属（特許文献6）などに属する微生物を用いる方法が知られている。本発明者らはこれまで、人工変異による育種および組換えDNA技術を使って、メチロフィラス属およびメチロバチラス属細菌を用いたL-アミノ酸製造法の開発を行ってきた（特許文献7、8）。

【0005】

近年、L-アミノ酸を特異的に微生物の菌体の外部に排出する機能を持つタンパク質および遺伝子が同定され、特にVrljicらは、コリネバクテリウム属細菌からL-リジンの菌体外への排出に関与する遺伝子を同定した（非特許文献1）。この遺伝子はlysEと名付けられ、同遺伝子をコリネバクテリウム属細菌において増強させることによって、コリネバクテリウム属細菌のL-リジン生産性が向上することが報告されている（特許文献9）。また、エシェリヒア・コリにおいてアミノ酸排出タンパク質の発現量を上昇させることにより、いくつかのL-アミノ酸の生産性を向上させることができることが知られている（特許文献10）。例えば、エシェリヒア・コリにおいては、ORF306遺伝子の発現を増強することによって、シスチン、システイン等の生産性が向上することが報告されている（特許文献11）。

【0006】

しかし、これまでメタノール資化性菌を用いたメタノールからの発酵法によるアミノ酸製造において、アミノ酸の排出強化による生産性向上を示した例はない。また、メタノール資化細菌で、排出活性を発揮できる、アミノ酸排出遺伝子についての報告はない。

【0007】

【特許文献1】

特開昭45-25273号公報

【特許文献 2】

特公昭49-125590号公報

【特許文献 3】

特開昭50-25790号公報

【特許文献 4】

特開昭52-18886号公報

【特許文献 5】

特開平4-91793号公報

【特許文献 6】

特開平3-505284号公報

【特許文献 7】

国際公開第00/61723号パンフレット (WO 00/61723)

【特許文献 8】

特開2001-120269号

【特許文献 9】

国際公開第97/23597号パンフレット (WO 97/23597)

【特許文献 1 0】

特開平2000-189180号

【特許文献 1 1】

欧州特許出願公開第885962号

【非特許文献 1】

Molecular Microbiology 22:815-826(1996)

【0 0 0 8】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は、安価に大量に入手可能なメタノールを用いて、効率良く、L-リジン又はL-アルギニンを製造する方法を提供することを課題とする。

【0 0 0 9】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、上記課題を解決するために鋭意検討を重ねた結果、メタノール資化性菌、とりわけメチロフィラス属細菌とメチロバチラス属細菌を利用してL-アミノ酸、とりわけL-リジンあるいはL-アルギニンを製造する場合、それらのL-アミノ酸の菌体外への排出過程が一つの障壁であること、そして、この障壁を打破する因子として、特にこれら微生物にてアミノ酸の排出活性を発揮する遺伝子を取得することに成功し、これを利用することで効率の良いアミノ酸生産ができることを見いだした。

【0010】

本発明者らは、既に知られているコリネバクテリウム属細菌由来のlysE遺伝子を、メタノール資化性菌に導入し、そのアミノ酸生産に及ぼす効果を調べたが、導入したlysE遺伝子には変異や欠損が生じ、lysEを機能させることはできなかった。排出を司るようなタンパク質は、細胞膜に組み込まれてその機能を発揮するため、タンパク質と膜の脂質組成などの状態とが両方で適切なものである必要がある。したがって、異種の生物に由来する膜タンパク質を、その機能を発揮する形で発現させることは困難であると考えられ、上述した結果は、それを裏付けるものであった。

【0011】

本発明者らは、上記のL-アミノ酸の排出遺伝子に関する研究の過程において、偶然にもメタノール資化性菌において機能し得る変異遺伝子を取得した。また、同変異遺伝子を利用することで、メタノール資化性菌を用いたアミノ酸製造において、顕著な効果を見出している。そして、同研究をさらに進め、メタノール資化性菌において機能し得る複数の変異遺伝子を取得することに成功した。

【0012】

本発明は、上記のようにして完成するに至ったものであり、その要旨は以下のとおりである。

(1) コリネ型細菌のLysEタンパク質又はその相同タンパク質の変異体をコードするDNAであって、同変異体は、メタノール資化性菌に導入したときに、同細菌にL-リジンアナログに対する耐性を付与する活性を有することを特徴とするDNA。

(2) 前記変異体が、下記 (A) または (B) に示すタンパク質である (1) の DNA。

(A) 配列番号 2 に記載のアミノ酸配列を有し、かつ、少なくとも 56 位のグリシン残基が他のアミノ酸残基に置換されたタンパク質。

(B) 配列番号 2 に記載のアミノ酸配列において、少なくとも 56 位のグリシン残基が他のアミノ酸残基に置換され、かつ、56 位以外の位置において 1 若しくは数個のアミノ酸残基の置換、欠失、挿入又は付加を含むアミノ酸配列を有し、かつ、メタノール資化性菌に導入したときに、同細菌に L-リジンアナログに対する耐性を付与する活性を有するタンパク質。

(3) 下記 (a) 又は (b) に示す DNA である (2) の DNA。

(a) 配列番号 1 に記載の塩基配列を有し、かつ、コードされるタンパク質の 56 位のグリシン残基が他のアミノ酸残基に置換される変異を有する DNA。

(b) 配列番号 1 に記載の塩基配列又は同塩基配列から調製され得るプローブとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ、メタノール資化性菌に導入したときに、同細菌に L-リジンアナログに対する耐性を付与する活性を有する DNA。

(4) 前記他のアミノ酸残基がセリン残基である (2) 又は (3) の DNA。

(5) 前記 L-リジンアナログが S-(2-アミノエチル)-システインである (1) ~ (4) のいずれかの DNA。

(6) 前記メタノール資化性菌がメチロフィラス属細菌又はメチロバチラス属細菌である (1) ~ (5) のいずれかの DNA。

(7) メチロフィラス属又はメチロバチルス属に属し、(1) ~ (6) のいずれかの DNA が、発現可能な形態で導入され、かつ、L-リジン又は L-アルギニン生産能を有する細菌。

(8) (7) の細菌を培地に培養し、該培養物中に L-リジン又は L-アルギニンを生産蓄積させ、該培養物から L-リジン又は L-アルギニンを採取することを特徴とする L-リジン又は L-アルギニンの製造法。

(9) 前記培地がメタノールを主たる炭素源とすることを特徴とする (8) の L-リジン又は L-アルギニンの製造法。

【0013】

【発明の実施の形態】

以下、本発明を詳細に説明する。

<1>本発明のDNA

本発明のDNAは、コリネ型細菌のLysEタンパク質又はその相同タンパク質の変異体をコードするDNAであって、メタノール資化性菌に導入したときに、LysEタンパク質の機能を発現し得るDNAである。

ここで、「LysEタンパク質の機能」とは、少なくとも以下の(1)又は(2)に示すいずれかの機能をいう。

【0014】

(1) 前記変異体をコードするDNAをメタノール資化性菌に導入したときに、同細菌にL-リジンアナログに対する耐性を付与する機能。

前記細菌に「L-リジンアナログに対する耐性を付与する」とは、前記変異体をコードするDNAが導入されたメタノール資化性菌が、同DNAを保持しない細菌、例えばメタノール資化性菌の野生株よりも高濃度のL-リジンアナログ存在下で生育できるようになることをいう。例えば、一定濃度のL-リジンアナログを含有する寒天培地で一定時間培養し、前記DNAが導入されたメタノール資化性菌の形質転換株がコロニーを形成し、非形質転換株がコロニーを形成しないときは、前記形質転換株はL-リジンアナログに対する耐性が付与されている。L-リジンアナログとしては、S-(2-アミノエチル)-システインである請求項1～3のいずれか一項に記載のDNA。

【0015】

(2) 前記変異体をメタノール資化性菌に導入したときに、L-リジンもしくはL-アルギニン又はこれらの両方のL-アミノ酸の細胞外への排出を促進する機能。

「L-リジンもしくはL-アルギニン又はこれらの両方のL-アミノ酸の細胞外への排出を促進する」とは、本発明のDNAを保持しないメタノール資化性菌に比べて、本発明のDNAを保持するメタノール資化性菌を培養したときに、培地中に排出されるL-リジンもしくはL-アルギニン又はこれらの両方のL-ア

ミノ酸の量を増大させることをいう。L-アミノ酸の細胞外への排出の促進は、その結果として、本発明のDNAを保持しないメタノール資化性菌に比べて、本発明のDNAを保持するメタノール資化生菌を培養したときに培地中に蓄積するL-アミノ酸濃度が高くなることによって観察される。また、L-アミノ酸の細胞外への排出の促進は、本発明のDNAをメタノール資化性菌に導入したときに、細胞内のL-アミノ酸濃度が低下することによっても観察され得る。

【0016】

本発明においてメタノール資化性菌、即ち、メチロトロフとは、メタノールを主たる炭素源として生育することができる細菌であって、本発明のDNAを導入することによって、LysEタンパク質の機能が発現され得る細菌である。具体的には、メチロフィラス・メチロトロファス (*Methylophilus methylotrophus*) 等のメチロフィラス属細菌、及び、メチロバチラス・グリコゲネス (*Methylobacillus glycohenes*)、メチロバチラス・フラゲラタム (*Methylobacillus flagellatum*) 等のメチロバチラス属細菌が挙げられる。

【0017】

メチロフィラス・メチロトロファスとしては、AS1株 (NCIMB10515) 等が挙げられる。メチロフィラス・メチロトロファスAS1株 (NCIMB10515) は、ナショナル・コレクション・オブ・インダストゥリアル・アンド・マリン・バクテリア (National Collections of Industrial and Marine Bacteria、住所 NCIMB Ltd., Torry Research Station 135, Abbey Road, Aberdeen AB9 8DG, United Kingdom) から入手可能である。

【0018】

また、メチロバチラス・グリコゲネスとしては、T-11株 (NCIMB 11375)、ATCC 21276株、ATCC 21371株、ATR80株 (Appl. Microbiol. Biotechnol., (1994)、42巻、p67-72に記載)、A513株 (Appl. Microbiol. Biotechnol., (1994)、42巻、p67-72に記載) 等が挙げられる。メチロバチラス・グリコゲネスNCIMB 11375株は、ナショナル・コレクション・オブ・インダストゥリアル・アンド・マリン・バクテリア (National Collections of Industrial and Marine Bacteria、住所 NCIMB Ltd., Torry Research Station 135, Abbey Road, Aberdeen AB9 8D

G, United Kingdom) から入手可能である。また、メチロバチラス・フラゲラタムとしては、KT株 (Arch. Microbiol., (1988), 149巻、p441-446に記載) 等が挙げられる。

【0019】

本発明のDNAの一形態は、配列番号2に記載のアミノ酸配列を有し、かつ、少なくとも56位のグリシン残基が他のアミノ酸残基に置換されたタンパク質をコードするDNAである。

【0020】

また、本発明のDNAのより具体的な形態は、配列番号2に記載のアミノ酸配列を有し、かつ、以下の変異を有するDNAである。

- (i) 56位のグリシン残基の他のアミノ酸残基への置換
- (ii) 56位のグリシン残基の他のアミノ酸残基への置換、及び55位のアラニン残基の他のアミノ酸残基への置換
- (iii) 56位のグリシン残基の他のアミノ酸残基への置換、及び137位のアスパラギン酸の他のアミノ酸残基への置換

56位における置換として具体的には、グリシン残基からセリン残基への置換が挙げられる。55位における置換としては、アラニン残基からスレオニン残基への置換が挙げられる。137位における置換としては、アスパラギン酸残基からグリシン残基への置換が挙げられる。

【0021】

上記置換を有する本発明のDNAのさらに具体的な形態は、後記実施例に示すlysE562、lysE564、lysE565と名付けられたDNAである。これらは、コリネバクテリウム属細菌で報告されているlysE遺伝子のホモログとして、ブレヴィバクテリウム・ラクトファーマンタムから単離された遺伝子の変異体である。したがって、本発明のDNAを、便宜的に「変異型lysE」、本発明のDNAによってコードされるタンパク質を「変異型LysE」と称することがある。

【0022】

コリネ型細菌のLysEタンパク質をコードするDNAとして、ブレヴィバクテリウム・ラクトファーマンタムの野生型のlysEの塩基配列を配列番号1、アミノ酸配

列を配列番号 2 に示す。

【0023】

lysE564 がコードするタンパク質のアミノ酸配列は、配列番号 2 に示す野生型 LysE のものと比較すると、アミノ末端から 56 番目のセリンがグリシンへ変化しており、lysE562 がコードするタンパク質のアミノ酸配列は、配列番号 2 に示す野生型 LysE と比較して、アミノ末端から 56 番目のセリンがグリシンへ、137 番目のアスパラギン酸がグリシンへ、そして、lysE565 がコードするタンパク質のアミノ酸配列は、野生型 LysE のものと比較すると、アミノ末端から 56 番目のセリンがグリシンへ、55 番目のアラニンがスレオニンへ置換したアミノ酸配列を持っていることがわかった。そして、それらに共通する変異点は、56 番目のセリンからグリシンへの変化であることが発見された。この位置における変化が、特にメチロトロフでの L-リジン排出に活性のある排出担体を作製する上で、重要なものと推察された。

【0024】

本発明の DNA は、コードされる変異型 LysE が、上記変異を有し、かつ、メタノール資化性菌中で LysE タンパク質の機能を示す限り、56 位、又は 55 位及び 56 位、又は 56 位及び 137 位以外の位置において、1 若しくは数個のアミノ酸残基の置換、欠失、挿入又は付加を含むアミノ酸配列を有していてもよい。ここで、「数個」とは、アミノ酸残基のタンパク質の立体構造における位置や種類によっても異なるが、具体的には 2 から 10 個、好ましくは、2 から 5 個、より好ましくは 2 から 3 個である。

【0025】

上記のような変異型 LysE と実質的に同一のタンパク質をコードする DNA は、例えば部位特異的変異法によって、特定の部位のアミノ酸残基が置換、欠失、挿入、又は付加を含むように、変異型 lysE の塩基配列を改変することによって得られる。また、上記のような改変された DNA は、従来知られている変異処理によっても取得され得る。変異処理としては、変異処理前の DNA をヒドロキシルアミン等でインビトロ処理する方法、及び変異処理前の DNA を保持する微生物、例えばエシェリヒア属細菌を、紫外線照射または N-メチル-N'-ニトロ-N-ニ

トロソグアニジン (NTG) もしくは亜硝酸等の通常変異処理に用いられている変異剤によって処理する方法が挙げられる。これらの方法は、Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T., "Molecular Cloning A Laboratory Manual, Second Edition", Cold Spring Harbor Laboratory Press, (1989)等に記載されている。

【0026】

上記のような変異を有するDNAを、メタノール資化性菌で発現させ、発現産物の活性を調べることにより、変異型LysEと実質的に同一のタンパク質をコードするDNAが得られる。

【0027】

尚、本発明において、アミノ酸残基の位置は、必ずしも個々のLysEタンパク質における絶対的な位置ではなく、配列番号2に示すアミノ酸配列に対する相対的な位置を示す。例えば、配列番号2に示すアミノ酸配列において、56位よりもN末端側で1アミノ酸残基の欠失があると、前記56位のアミノ酸残基はN末端から55番目のアミノ酸残基となる。そのような場合、N末端から55番目のアミノ酸残基は、配列番号2における56位のアミノ酸残基に相当するアミノ酸残基であるから、「56位」のアミノ酸残基である。

【0028】

コリネ型細菌のLysEタンパク質又はその相同タンパク質をコードするDNA、すなわちlysE遺伝子またはその相同遺伝子の供与微生物としては、それらの遺伝子の改変体がメタノール資化性菌中でL-リジン排出活性を発現することができるものを保持する微生物であれば、いかなる微生物でも利用できる。具体的には、コリネバクテリウム・グルタミカム、ブレヴィバクテリウム・ラクトファーマンタム等のコリネ型細菌、エシェリヒア・コリ等のエシェリヒア属細菌、シュールドモナス・アエルジノーサ等のシュールドモナス属細菌、マイコバクテリウム・ツベルクロシス等のマイコバクテリウム属細菌等が挙げられる。

【0029】

LysEの相同遺伝子としては、配列番号1に示す塩基配列又はその一部を有するプローブとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ、前記のアミノ

酸置換により、メタノール資化性菌中でLysEタンパク質の機能を有するタンパク質をコードするDNAが挙げられる。前記「ストリンジェントな条件」とは、いわゆる特異的なハイブリッドが形成され、非特異的なハイブリッドが形成されない条件をいう。この条件を明確に数値化することは困難であるが、一例を示せば、相同性が高いDNA同士、例えば80%以上、好ましくは90%以上、より好ましくは95%以上の相同性を有するDNA同士がハイブリダイズし、それより相同性が低いDNA同士がハイブリダイズしない条件、あるいは通常のサザンハイブリダイゼーションの洗いの条件である60℃、1×SSC、0.1%SDS、好ましくは、0.1×SSC、0.1%SDSに相当する塩濃度でハイブリダイズする条件が挙げられる。

【0030】

プローブとして、配列番号1の塩基配列の一部の配列を用いることもできる。そのようなプローブは、配列番号1の塩基配列に基づいて作製したオリゴヌクレオチドをプライマーとし、配列番号1の塩基配列を含むDNA断片を鋳型とするPCRによって作製することができる。プローブとして、300bp程度の長さのDNA断片を用いる場合には、ハイブリダイゼーションの洗いの条件は、50℃、2×SSC、0.1%SDSが挙げられる。

【0031】

メチロフィラス属細菌又はメチロバチラス属細菌等のメタノール資化性菌において変異型lysE遺伝子を増強する場合は、その遺伝子断片を、メタノール資化性菌で機能するベクター、好ましくはマルチコピー型ベクターと連結して、組換えDNAを作製し、これをメタノール資化性菌の宿主に導入して形質転換すればよい。あるいは、同遺伝子をトランスポゾンに搭載し、染色体へ組み込んでもよい。また、メタノール資化性菌内で強力転写を誘導するようなプロモーターを、その遺伝子の上流に連結させることも可能である。

【0032】

lysEを開示している文献(WO 97/23597)には、コリネ型細菌のlysE遺伝子をコリネ型細菌に導入した場合のみを提示している。そして、排出されたアミノ酸としてL-リジンのみが示され、更に、LysEを含む新しい排出系のタンパク質の

構造体として、膜横断ヘリックスが6個のものを開示している。しかし、本発明者らは、メタノール資化性細菌においては、コリネ型細菌に由来するようなLysEは全く機能しないことを確認した。更に、取得できた因子は、特異的な箇所のアミノ酸置換の変異をもつ、新しいL-リジンの排出担体であり、このような因子は、先のlysE特許明細書からは全く類推できるものではない。

【0033】

<2>本発明のメタノール資化性菌

本発明のメタノール資化性菌は、前記本発明のDNAが発現可能な形態で導入され、かつ、L-リジン又はL-アルギニン生産能を有するメタノール資化性菌である。本発明のメタノール資化性菌は、L-リジン又はL-アルギニン生産能を有するメタノール資化性菌に本発明のDNAを導入することによって得られる。また、本発明のDNAが導入されたメタノール資化性菌に、L-リジン又はL-アルギニン生産能を付与することによっても、本発明のメタノール資化性菌を得ることができる。また、本発明のメタノール資化性菌は、本発明のDNAが発現可能な形態で導入されたことによってL-リジン又はL-アルギニン生産能が付与されたものであってもよい。

メタノール資化性菌としては、前記したようなメチロフィラス属細菌又はメチロバチラス属細菌が挙げられる。

【0034】

L-リジン又はL-アルギニン生産能を有するメタノール資化性菌は、メタノール資化性菌の野生株にL-リジン又はL-アルギニン生産能を付与することにより取得され得る。L-リジン又はL-アルギニン生産能を付与するには、栄養要求性変異株、アナログ耐性株、又は代謝制御変異株の取得、L-リジン又はL-アルギニンの生合成系酵素が増強された組換え株の創製等、従来、コリネ型細菌又はエシェリヒア属細菌等の育種に採用されてきた方法を適用することができる（アミノ酸発酵、(株)学会出版センター、1986年5月30日初版発行、第77～100頁参照）。L-リジン又はL-アルギニン生産菌の育種において、付与される栄養要求性、アナログ耐性、代謝制御変異等の性質は、単独でもよく、2種又は3種以上であってもよい。また、増強されるL-アミノ酸生合成系酵素も

、単独であっても、2種又は3種以上であってもよい。さらに、栄養要求性、アナログ耐性、代謝制御変異等の性質の付与と、生合成系酵素の増強が組み合わされてもよい。

【0035】

例えば、L-リジン生産菌は、L-ホモセリン、又はL-スレオニン及びL-メチオニンを要求する変異株（特公昭48-28078号、特公昭56-6499号）、イノシトールまたは酢酸を要求する変異株（特開昭55-9784号、特開昭56-8692号）、又はオキサリジン、リジンヒドロキサメート、S-（2-アミノエチル）-システイン、 γ -メチルリジン、 α -クロロカプロラクタム、DL- α -アミノ- ϵ -カプロラクタム、 α -アミノ-ラウリルラクタム、アスパラギン酸-アナログ、スルファ剤、キノイド、又はN-ラウロイルロイシンに耐性を有する変異株として育種することができる。

【0036】

また、L-アルギニン生産菌は、サルファ剤、2-チアゾールアラニン又は α -アミノ- β -ヒドロキシ吉草酸等の薬剤に耐性を有する変異株；2-チアゾールアラニン耐性に加えて、L-ヒスチジン、L-プロリン、L-スレオニン、L-イソロイシン、L-メチオニンまたはL-トリプトファン要求性を有する変異株（特開昭54-44096号）；ケトマロン酸、フルオロマロン酸又はモノフルオロ酢酸に耐性を有する変異株（特開昭57-18989号）；アルギニノーレに耐性を有する変異株（特開昭62-24075号）；X-グアニジン（Xは脂肪酸又は脂肪鎖の誘導体）に耐性を有する変異株（特開平2-186995号）、5-アザウラシル、6-アザウラシル、2-チオウラシル、5-フルオロウラシル、5-ブロモウラシル、5-アザシトシン、6-アザシトシン等に耐性な変異株、アルギニンヒドロキサメート、2-チオウラシルに耐性な変異株、アルギニンヒドロキサメート及び6-アザウラシルに耐性な変異株（特開昭57-150381号参照）、ヒスチジンアナログ又はトリプトファンアナログに耐性な変異株（特開昭52-114092号参照）、メチニオン、ヒスチジン、スレオニン、プロリン、イソロイシニン、リジン、アデニン、グアニンまたはウラシル（またはウラシル前駆体）の少なくとも一つに要求性を有する変異株（特開昭52-99289号参照）、

アルギニンヒドロキサメートに耐性な変異株（特公昭51-6754号参照）、コハク酸要求性又は核酸塩基アナログに耐性な変異株（特開昭58-9692号）、アルギニン分解能を欠損し、アルギニンのアンタゴニスト及びカナバニンに耐性を有し、リジンを要求する変異株（特開昭52-8729号参照）、アルギニン、アルギニンヒドロキサメート、ホモアルギニン、D-アルギニン、カナバニン耐性、アルギニンヒドロキサメート及び6-アザウラシル耐性の変異株（特開昭53-143288号参照）、及び、カナバニン耐性の変異株（特開昭53-3586号参照）として育種することができる。

【0037】

次に、L-アミノ酸生合成系酵素遺伝子の増強によってL-アミノ酸生産能を付与又は増強する方法を、以下に例示する。

【0038】

L-リジン生産能は、例えば、ジヒドロジピコリン酸合成酵素活性及びアスパルトキナーゼ活性を増強することによって付与することができる。

メタノール資化性菌のジヒドロジピコリン酸合成酵素活性及びアスパルトキナーゼ活性を増強するには、ジヒドロジピコリン酸合成酵素をコードする遺伝子断片及びアスパルトキナーゼをコードする遺伝子断片を、メタノール資化性菌で機能するベクター、好ましくはマルチコピー型ベクターと連結して組み換えDNAを作製し、これをメタノール資化性菌の宿主に導入して形質転換すればよい。形質転換株の細胞内のジヒドロジピコリン酸合成酵素をコードする遺伝子及びアスパルトキナーゼをコードする遺伝子のコピー数が上昇する結果、これらの酵素の活性が増強される。以下、ジヒドロジピコリン酸合成酵素をDDPS、アスパルトキナーゼをAK、アスパルトキナーゼIIIをAKIIIと略すことがある。

【0039】

DDPSをコードする遺伝子及びAKをコードする遺伝子の供与微生物としては、メタノール資化性菌中でDDPS活性及びAK活性を発現することができる遺伝子を保持する微生物であれば、いかなる微生物でも使用できる。微生物は、野生株及びそれから誘導した変異株のいずれでもよい。具体的にはE. coli（エシェリヒア・コリ（*Escherichia coli*））K-12株、メチロフィラス・メチロトロファスAS1株（N

CIMB10515)、及びメチロバチラス・グリコゲネスとしては、T-11株 (NCIMB 11375) 等が挙げられる。エシェリヒア属細菌由来のDDPSをコードする遺伝子 (dapA、Richaud, F. et al. J. Bacteriol., 297(1986)) 及びAKIIIをコードする遺伝子 (lysC、Cassan, M., Parsot, C., Cohen, G.N. and Patte, J.C., J. Biol. Chem., 261, 1052(1986)) は、いずれも塩基配列が明らかにされているので、これらの遺伝子の塩基配列に基づいてプライマーを合成し、E. coli K-12等の微生物の染色体DNAを鋳型とするPCR法により、これらの遺伝子を取得することが可能である。以下、E. coli由来のdapA及びlysCを例として説明するが、本発明に用いる遺伝子は、これらに限定されるものではない。

【0040】

本発明に用いるDDPS及びAKは、L-リジンによるフィードバック阻害を受けないものであることが好ましい。E. coli由来の野生型DDPSはL-リジンによるフィードバック阻害を受けることが知られており、E. coli由来の野生型AKIIIはL-リジンによる抑制及びフィードバック阻害を受けることが知られている。したがって、メタノール資化性菌に導入するdapA及びlysCは、それぞれL-リジンによるフィードバック阻害が解除される変異を有するDDPS及びAKIIIをコードするものであることが好ましい。以下、L-リジンによるフィードバック阻害が解除される変異を有するDDPSを「変異型DDPS」、変異型DDPSをコードするDNAを「変異型dapA、又はdapA*」と呼ぶことがある。また、L-リジンによるフィードバック阻害が解除される変異を有するE. coli由来のAKIIIを「変異型AKIII」、変異型AKIIIをコードするDNAを「変異型lysC」と呼ぶことがある。

【0041】

尚、本発明においては、DDPS及びAKは必ずしも変異型である必要はない。例えば、コリネバクテリウム属細菌由来のDDPSはもともとL-リジンによるフィードバック阻害を受けないことが知られている。

【0042】

E. coli由来の野生型dapAの塩基配列を配列番号3に、同塩基配列によってコードされる野生型DDPSのアミノ酸配列を配列番号4に例示する。

【0043】

L-リジンによるフィードバック阻害を受けない変異型DDPSをコードするDNAとしては、配列番号4に示すアミノ酸配列において118位のヒスチジン残基がチロシン残基に置換された配列を有するDDPSをコードするDNAが挙げられる。また、L-リジンによるフィードバック阻害を受けない変異型AKIIIをコードするDNAとしては、352位のスレオニン残基がイソロイシン残基に置換された配列を有するAKIIIをコードするDNAが挙げられる。

【0044】

遺伝子のクローニングに使用されるプラスミドとしては、エシェリア属細菌等の微生物において複製可能なものであればよく、具体的には、pBR322、pTWV228、pMW119、pUC19等が挙げられる。

【0045】

また、メチロフィラス属細菌で機能するベクターとしては、例えばメチロフィラス属細菌で自律複製出来るプラスミドが挙げられる。具体的には、広宿主域ベクターであるRSF1010及びその誘導体、例えばpAYC32 (Chistorerdov, A.Y., Tsygankov, Y.D. Plasmid, 1986, 16, 161-167)、あるいはpMFY42 (gene, 44, 53(1990))、pRP301、pTB70 (Nature, 287, 396, (1980)) 等が挙げられる。

【0046】

一方、メチロバチラス属細菌で機能するベクターとしては、例えばメチロバチラス属細菌で自律複製出来るプラスミドが挙げられる。具体的には、広宿主域ベクターであるRSF1010及びその誘導体、例えばpMFY42 (gene, 44, 53(1990)) 等が挙げられる。

【0047】

dapA及びlysCとメチロフィラス属メタノール資化性細菌で機能するベクターを連結して組み換えDNAを調製するには、dapA及びlysCを含むDNA断片の末端に合うような制限酵素でベクターを切断する。連結は、T4 DNAリガーゼ等のリガーゼを用いて行うのが普通である。dapA及びlysCは、それぞれ別個のベクターに搭載してもよく、同一のベクターに搭載してもよい。

【0048】

変異型DDPSをコードする変異型dapA及び変異型AKIIIをコードする変異型lysC

を含むプラスミドとして、広宿主域プラスミドRSFD80が知られている (W095/16042号)。同プラスミドで形質転換されたE. coli JM109株は、AJ12396と命名され、同株は1993年10月28日に通産省工業技術院生命工学工業技術研究所に受託番号FERM P-13936として寄託され、1994年11月1日にブダペスト条約に基づく国際寄託に移管され、FERM BP-4859の受託番号のもとで寄託されている。RSFD80は、AJ12396株から、公知の方法によって取得することができる。

【0049】

RSFD80に含まれている変異型dapAは、配列番号13に示す野生型dapAの塩基配列において塩基番号597のCがTに変化した配列を有し、それによって、コードされる変異型DDPSは、配列番号14に示すアミノ酸配列において118位のヒスチジン残基がチロシン残基に置換された配列を有する。また、RSFD80に含まれている変異型lysCは、野生型lysCの塩基配列において塩基番号1638のCがTに変化した配列を有し、それによって、コードされる変異型AKIIIは、352位のスレオニン残基がイソロイシン残基に置換された配列を有する。

【0050】

上記のように調製した組換えDNAをメチロフィラス属細菌またはメチロバチラス属細菌に導入するには、十分な形質転換効率を得られる方法ならば、いかなる方法を用いてもよいが、例えば、エレクトロポレーション法 (Canadian Journal of Microbiology, 43, 197(1997)) が挙げられる。

【0051】

目的遺伝子の増強は、それをコードする遺伝子をメチロフィラス属細菌の染色体DNA上に多コピー存在させることによっても達成できる。メチロフィラス属細菌の染色体DNA上に目的遺伝子を多コピーで導入するには、染色体DNA上に多コピー存在する配列を標的に利用して相同組換えにより行う。染色体DNA上に多コピー存在する配列としては、レペティティブDNA、転移因子の端部に存在するインバーティッド・リピートが利用できる。あるいは、特開平2-109985号公報に開示されているように、目的遺伝子をトランスポゾンに搭載してこれを転移させて染色体DNA上に多コピー導入することも可能である。いずれの方法によっても形質転換株内の目的遺伝子のコピー数が上昇する結果、目的遺伝子活

性が増幅される。

【0052】

目的遺伝子の増幅は、上記の遺伝子増幅による以外に、目的遺伝子のプロモーター等の発現調節配列を強力なものに置換することによっても達成される（特開平1-215280号公報参照）。たとえば、lacプロモーター、trpプロモーター、trcプロモーター、tacプロモーター、ラムダファージのPRプロモーター、PLプロモーター、tetプロモーター、amyEプロモーター、spacプロモーター等が強力なプロモーターとして知られている。これらのプロモーターへの置換により、目的遺伝子の発現が強化されることによって目的遺伝子活性が増幅される。発現調節配列の増強は、目的遺伝子のコピー数を高めることと組み合わせてもよい。

【0053】

遺伝子断片とベクターを連結して組換えDNAを調製するには、遺伝子断片の末端に合うような制限酵素でベクターを切断する。連結は、T4DNAリガーゼ等のリガーゼを用いて行うのが普通である。DNAの切断、連結、その他、染色体DNAの調製、PCR、プラスミドDNAの調製、形質転換、プライマーとして用いるオリゴヌクレオチドの設定等の方法は、当業者によく知られている通常の方法を採用することができる。これらの方法は、Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T., "Molecular Cloning A Laboratory Manual, Second Edition", Cold Spring Harbor Laboratory Press, (1989)等に記載されている。

【0054】

DDPS及びAKの増強に加えて、他のL-リジン生合成に関与する酵素を増強してもよい。そのような酵素としては、ジヒドロジピコリン酸レダクターゼ、ジアミノピメリン酸脱炭酸酵素、ジアミノピメリン酸デヒドロゲナーゼ（以上、W096/40934号参照）、ホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ（特開昭60-87788号）、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ（特公平6-102028号）、ジアミノピメリン酸エピメラーゼ遺伝子、アスパラギン酸セミアルデヒド脱水素酵素等のジアミノピメリン酸経路の酵素、あるいはホモアコニット酸ヒドラターゼ遺伝子等のアミノアジピン酸経路の酵素等が挙げられる。

【0055】

また、メチロフィラス・メチロトロファス由来のアスパルトキナーゼ、アスパラギン酸セミアルデヒド脱水素酵素、ジヒドロジピコリン酸合成酵素、ジヒドロジピコリン酸レダクターゼ、及び、ジアミノピメリン酸脱炭酸酵素は、WO 00/61723に開示されている。

【0056】

さらに、本発明の微生物は、L-リジンの生合成経路から分岐してL-リジン以外の化合物を生成する反応を触媒する酵素の活性が低下または欠損していてもよい。L-リジンの生合成経路から分岐してL-リジン以外の化合物を生成する反応を触媒する酵素としては、ホモセリンデヒドロゲナーゼがある（WO 95/23864参照）。

【0057】

上記のL-リジン生合成に関与する酵素の活性を増強する手法は、L-アルギニンについても同様に適用することができる。

L-アルギニンは、例えば、アセチルオルニチンデアセチラーゼ活性、N-アセチルグルタミン酸- γ -セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ活性、N-アセチルグルタモキナーゼ活性、及びアルギニノサクシナーゼ活性を増強することによって付与することができる（特公平5-23750号）。

【0058】

また、グルタミン酸デヒドロゲナーゼ（EP 1 057 893 A1）、アルギニノコハク酸シンターゼ（EP 0 999 267 A1）、カルバモイルリン酸シンセターゼ（EP 1 026 247 A1）、もしくはN-アセチルグルタミン酸シンターゼ（特開昭57-5693号参照）の活性を増強すること、又は、アルギニンリプレッサーをコードする遺伝子（argR）を破壊することによって、L-アルギニン生産能を向上させることができる。

<3> L-リジン又はL-アルギニンの製造

上記のようにして得られるL-リジン又はL-アルギニン生産能を有するメチロフィラス属細菌あるいはメチロバチラス属細菌等のメタノール資化性菌を培地に培養し、該培養物中にL-リジン又はL-アルギニンを生産蓄積させ、該培養

物から L-リジン又は L-アルギニンを採取することにより、L-リジン又は L-アルギニンを製造することができる。

【0059】

本発明で用いられる微生物は、通常メタノール資化性微生物の培養に用いられる方法で培養することができる。本発明で用いられる培地は、炭素源、窒素源、無機イオン及び必要に応じてその他の有機微量成分を含む培地であれば、天然培地、合成培地のいずれでも用いられる。

【0060】

メタノールを主たる炭素源として用いると、L-リジン又は L-アルギニンを安価に製造することができる。メタノールは、主たる炭素源として用いる場合は、培地中に 0.001~30% 添加する。窒素源としては硫酸アンモニウムなどを培地に添加して用いる。これらの他に、通常、リン酸カリウム、リン酸ナトリウム、硫酸マグネシウム、硫酸第一鉄、硫酸マンガンなどの微量成分が少量添加される。

【0061】

培養は、振とう培養又は通気攪拌培養などの好気条件下、pH5~9、温度 20~45℃ に保持して行われ、通常 24~120 時間で終了する。

培養物からの L-リジン又は L-アルギニンの採取は、通常イオン交換樹脂法、沈殿法、その他の公知の方法を組み合わせることにより実施できる。

【0062】

【実施例】

以下、本発明を実施例によりさらに具体的に説明する。

試薬は、特記しない限り和光純薬、又はナカライテスク社製のものを用了。各実施例で用いる培地の組成は以下に示すとおりである。いずれの培地も pH は NaOH、KOH または HCl で調整した。

【0063】

(LB 培地)

バクトトリプトン (ディフコ社製)	10g/L
酵母エキス (ディフコ社製)	5g/L
NaCl	10g/L

pH7.0

[120℃、20分間蒸気滅菌を行った。]

【0064】

(LB寒天培地)

LB培地

バクトアガー 15g/L

[120℃、20分間蒸気滅菌を行った。]

【0065】

(SEII培地)

K_2HPO_4 1.9g/L

NaH_2PO_4 1.56g/L

$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2g/L

$(NH_4)_2SO_4$ 5g/L

$CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 5 μ g/L

$MnSO_4 \cdot 5H_2O$ 25 μ g/L

$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 23 μ g/L

$CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 72mg/L

$FeCl_3 \cdot 6H_2O$ 9.7mg/L

$CaCO_3$ (関東化学製) 30g/L

メタノール 2% (vol/vol)

pH7.0

[メタノール以外は121℃、15分間蒸気滅菌を行った。良くさめてからメタノールを添加した。]

【0066】

(SEII寒天培地)

K_2HPO_4 1.9g/L

NaH_2PO_4 1.56g/L

$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2g/L

$(NH_4)_2SO_4$ 5g/L

CuSO ₄ ·5H ₂ O	5 μg/L
MnSO ₄ ·5H ₂ O	25 μg/L
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	23 μg/L
CaCl ₂ ·2H ₂ O	72mg/L
FeCl ₃ ·6H ₂ O	9.7mg/L
メタノール	0.5% (vol/vol)

pH7.0

バクトアガー(ディフコ社製) 15g/L

[メタノール以外は121℃、15分間蒸気滅菌を行った。良くさめてからメタノールを添加した。]

【0067】

【実施例1】

<1>変異型lysE遺伝子ライブラリーの作製

【0068】

まずは、コリネバクテリウム属細菌で知られているL-リジンの排出を促進する遺伝子の相同遺伝子であるlysE遺伝子をブレヴィバクテリウム属細菌よりクローニングし、メチロフィラス属細菌での発現を試みた。

(1) pRSlysEの構築

メチロフィラス属細菌にlysEを導入するために、公知のプラスミドpRS (特表平3-501682号公報参照) を用いて、lysE発現用プラスミドpRSlysEを構築した。pRSは、RSF1010の誘導体である広宿主域ベクタープラスミドpAYC32 (Chistorerdo v, A.Y., Tsygankov, Y.D. Plasmid, 1986, 16, 161-167) に由来するpVIC40プラスミド (W090/04636国際公開パンフレット、特表平3-501682号公報) より、同プラスミドが持つスレオニンオペロンをコードするDNA領域を削除してベクター部分のみを持つプラスミドである。

【0069】

具体的には、pRSは以下のようにして構築した。pVIC40プラスミドをEcoRIで消化し、フェノール・クロロホルム溶液を加えて混合し、反応を停止させた。反応液を遠心分離した後、上層を回収し、エタノール沈殿にてDNAを回収後、0.8%ア

ガロースゲルにて分離し、ベクター側を含む約8キロベースペア（以下、「kbp」と記載）のDNA断片をEASY TRAP Ver.2（DNA回収キット、宝酒造社製）を用いて回収した。このように調製したpVIC40プラスミドのベクター領域断片を、DNA Ligation Kit Ver.2（宝酒造製）を用いて自己連結させた。この連結反応溶液でエシェリヒア・コリ（*E. coli* JM109 competent cells、宝酒造製）を形質転換し、20mg/Lのストレプトマイシンを含むLB寒天培地に塗布し、37℃で一晩保温した。寒天培地上に出現したコロニーを20mg/Lのストレプトマイシンを含むLB液体培地に接種し、37℃で8時間振盪培養した。アルカリ-SDS法にて各培養液からプラスミドDNAを抽出し、制限酵素で消化して構造を確認し、pRSを得た。

【0070】

次に、pRSより、tacプロモーターを持つプラスミドpRStacを図1に示す方法で構築した。pRSベクターを制限酵素EcoRIおよびPstIで消化し、フェノール・クロロホルム溶液を加えて混合し、反応を停止させた。反応液を遠心分離した後、上層を回収し、エタノール沈殿にてDNAを回収後、0.8%アガロースゲルにて分離し、約8kbpのDNA断片をEASY TRAP Ver.2（DNA回収キット、宝酒造社製）を用いて回収した。一方、tacプロモーター領域を、pRK223-3プラスミド（発現用ベクター、Pharmacia社製）を鋳型とし、配列番号7および8に示すプライマーを用いて、PCRにより増幅した（変性94℃-20秒、アニーリング55℃-30秒、伸長反応72℃-60秒のサイクルを30サイクル行った）。PCR反応にはPyrobest DNA polymerase（宝酒造社製）を使用した。増幅されたtacプロモーターを含むDNA断片をPCRprep（Promega社製）にて精製した後、あらかじめプライマー中にデザインしておいた制限酵素サイト、すなわちEcoRIおよびEcoT22Iで消化し、フェノール・クロロホルム溶液を加えて混合し、反応を停止させた。反応液を遠心分離した後、上層を回収し、エタノール沈殿にてDNAを回収した後、0.8%アガロースゲルにて分離し、約0.15kbpのDNA断片をEASY TRAP Ver.2を用いて回収した。

【0071】

上記のように調製したpRSベクター消化物と、tacプロモーター領域断片を、DNA Ligation Kit Ver.2（宝酒造製）を用いて連結させた。この連結反応溶液でエシェリヒア・コリ（*E. coli* JM109 competent cells、宝酒造製）を形質転換し

、20mg/Lのストレプトマイシンを含むLB寒天培地に塗布し、37℃で一晩保温した。寒天培地上に出現したコロニーを20mg/Lのストレプトマイシンを含むLB液体培地に接種し、37℃で8時間振盪培養した。アルカリ-SDS法にて各培養液からプラスミドDNAを抽出し、制限酵素で消化して構造を確認し、pRStacを得た。pRSベクター上のストレプトマイシン耐性遺伝子の転写方向とtacプロモーターの転写方向が同じ向きになっているものを、pRStacとして選択した。

【0072】

上記のようにして得たpRStacを、Sse8387I（宝酒造製）およびSapI（ニューイングランドバイオラボ社製）で消化し、フェノール・クロロホルム溶液を加えて混合し、反応を停止させた。反応液を遠心分離した後、上層を回収し、エタノール沈殿にてDNAを回収後、0.8%アガロースゲルで分離し、約9.0kbpのDNA断片を回収した。

【0073】

また、ブレヴィバクテリウム・ラクトファーマンタム 2256株（ATCC13869）より抽出した染色体を鋳型として、配列番号9および10に示すプライマーを用いたPCR法（変性94℃-20秒、アニーリング55℃-30秒、伸長反応72℃-90秒）によりlysE遺伝子断片を増幅した。PCR反応には、Pyrobest DNA polymerase（宝酒造社製）を使用した。このとき、lysE遺伝子がメチロフィラス属細菌中で発現可能となるように、lysE遺伝子の翻訳開始コドンより9～15bp塩基を、メチロフィラス属細菌で機能することがわかっている配列（Wyborn, N. R., Mills, J., Williams, S. G. and Jones, C.W., Eur.J.Biochem., 240, 314-322(1996)）に変更するようにプライマーをデザインした。得られた断片をPCRprep（Promega社製）にて精製した後、制限酵素Sse8387IおよびSapIで消化した。フェノール・クロロホルム溶液を加えて混合し、反応を停止させた。反応液を遠心分離した後、上層を回収し、エタノール沈殿にてDNAを回収し、0.8%アガロースゲルで回収した。

【0074】

上記のように調製したpRStacベクター消化物と、lysE遺伝子領域断片を、DNA Ligation Kit Ver.2（宝酒造製）を用いて連結させた。この連結反応溶液でエシ

エリヒア・コリ (E. coli JM109 competent cells、宝酒造製) を形質転換し、20mg/Lのストレプトマイシンを含むLB寒天培地に塗布し、37℃で一晩保温した。寒天培地上に出現したコロニーを20mg/Lのストレプトマイシンを含むLB液体培地に接種し、37℃で8時間振盪培養した。アルカリ-SDS法にて各培養液からプラスミドDNAを抽出し、制限酵素での消化および塩基配列の決定により構造を確認して、pRSlysEを得た (図1)。pRSlysEは、tacプロモーターの転写方向に対して、lysE遺伝子の転写方向が同じ向きになるように配置されている。

【0075】

(2) メチロフィラス属細菌へのpRSlysEの導入

上記のようにして得られたpRSlysEを、エレクトロポレーション法 (Canadian Journal of Microbiology, 43, 197 (1997)) によりメチロフィラス・メチロトロファスAS1株 (NCIMB10515) に導入した。なお、対照として、pRSをpRSlysEと同様にしてAS1株に導入した。その結果、対照として用いたpRSでは1 μ gのDNAあたり数千個のコロニーを得たが、それに対してpRSlysEでは数個のコロニーしか得られなかった。

【0076】

pRSlysEが導入されたと思われる形質転換株よりプラスミドを抽出して塩基配列を調べたところ、調べたすべてのプラスミドにおいて、lysEをコードする領域内に自然変異が導入され、それらの変異のうちいくつかは、アミノ酸をコードするコドンが翻訳を停止させる停止コドンに置き換わるナンセンス変異が導入されていた。また、別のプラスミドではlysE遺伝子に欠失がみられた。これらのプラスミドに搭載されているlysEは、いずれも、機能が失われていることが考えられた。

【0077】

以上のように、全長のlysE遺伝子を搭載するpRSlysEのメチロフィラス・メチロトロファスへの導入頻度は極めて低く、また機能を失わせるような変異が導入されたlysE変異遺伝子を持つプラスミドのみが導入できたことと併せて考えると、メチロフィラス・メチロトロファスにlysE遺伝子を導入することは致死的であると考えられた。このことは、lysE遺伝子が異種の細菌においてL-リジンの排

出に関して万能に機能するものではないことを示している。

【0078】

変異が導入されたpRSlysEを持つメチロフィラス・メチロトロファスAS1株を、50mg/Lのストレプトマイシンを含むSEIIプレートに塗り広げ、37℃にて1晩培養したのち、培地表面約10cm²の菌体をかきとって50mg/Lのストレプトマイシンを含むSEII生産培地(20ml)に植菌し、37℃にて34時間振盪培養した。培養終了後、菌体を遠心分離により除去し、培養上清に含まれるL-リジン濃度をアミノ酸分析計(日本分光製、高速液体クロマトグラフィー)で定量した。その結果、変異型lysE遺伝子が導入されてもL-リジンの排出が促進されたと思われる株はほとんど得られなかった。

【0079】

上記のように、既に知られているコリネバクテリウム属細菌由来のlysE遺伝子は、メタノール資化性菌に導入すると致死的であり、わずかに得られる導入株は、導入したlysE遺伝子には変異や欠損が生じ、lysEを機能させることはできなかった。アミノ酸の排出を司るようなタンパク質は、細胞膜に組み込まれてその機能を発揮するため、タンパク質と膜の脂質組成などの状態の両者が適切なものである必要がある。したがって、異種の生物に由来する膜タンパク質を、その機能を発揮する形で発現させることは困難であると考えられた。そこで、自然変異よりもより多くの変異を積極的に導入できる人工変異導入法を用いれば、その中からうまくL-リジン排出能を持った変異型lysEを取得できるのではないかと考えた。この考えに基づき、後述するようにヒドロキシルアミンを用いた変異導入法を用いて変異型lysEライブラリーを作製した。

さらに本発明者らは、メタノール資化性菌においてL-リジンを排出する活性のあるlysE変異型遺伝子が、メタノール資化性菌に導入された場合、L-リジンのアナログ化合物であるAEC(S-(2-アミノエチル)-システイン)に対する耐性度が上昇するのではないかと考えた。この考えに基づき後述するスクリーニング系を開発した。まず、変異lysEライブラリーの作製について詳細に述べる。

【0080】

(2) pRSlysEプラスミドの変異処理

野生型のlysEを搭載するpRSlysEプラスミドを保持するE. coli JM109株（宝酒造から入手可能）を20mg/Lのストレプトマイシンを含むLB液体培地に接種し、37℃で8時間振盪培養した。アルカリ-SDS法にて各培養液からプラスミドDNAを抽出した。

そして、調製したpRSlysEに、ヒドロキシルアミンを用いた試験管内の変異導入方法にて変異を導入した。すなわち、最終濃度でpH6.0に調製したリン酸カリウムバッファーを250mM、pH6.0に調整したヒドロキシルアミン溶液を400mMおよび2 μ gのpRSlysEプラスミドを含み、水で全量を200マイクロリットルに調製した溶液を準備し、これを75℃に2時間または3時間保温した。この後、この溶液から、EASY TRAP Ver.2（DNA回収キット、宝酒造社製）を用いてpRSlysEプラスミドを回収した。ヒドロキシルアミンと2時間反応させたプラスミドと、3時間反応させたプラスミドを混ぜ合わせることによって、様々な確率で変異が導入されたpRSlysE集合体を取得した。

【0081】

上記のようにして得た、様々な位置に変異が導入されたとと思われる変異pRSlysE集合体を増幅し、大腸菌でライブラリーを作るために、このプラスミド集合体でエシェリヒア・コリ（E. coli JM109 competent cells、宝酒造製）を形質転換し、20mg/Lのストレプトマイシンを含むLB寒天培地に塗布し、37℃で一晩保温した。寒天培地上に出現したコロニーをすべてかきとり、20mg/Lのストレプトマイシンを含むLB液体培地に接種し、37℃で8時間振盪培養した。アルカリ-SDS法にて各培養液からプラスミドDNAを抽出し、変異pRSlysEプラスミドライブラリーとした。

【0082】

<2>メチロフィラス属細菌への変異pRSlysEプラスミドの導入とL-アミノ酸生産

(1) 人工変異が導入されたlysEライブラリーからの機能型lysEのスクリーニング

上記のようにして得られた変異pRSlysEプラスミドライブラリーを、エレクト

ロポレーション法 (Canadian Journal of Microbiology, 43, 197 (1997)) によりメチロフィラス・メチロトロファスAS1株 (NCIMB10515) に導入した。なお、対照として、野生型pRSlysEをAS1株に導入した。その結果、対照として用いたpRSlysEでは、以前の検討の結果が再現され、1 μ gのDNAあたり数個のコロニーしか得られなかった。それに対して変異pRSlysEプラスミドライブラリーでは数百から数千のコロニーが得られた。これまでの検討から、野生型のpRSlysEを導入した場合の出現する数個のコロニーはそのほとんどすべてが、自然変異導入によりlysEが機能を失ったものであることがわかっている。すなわち全長のlysE遺伝子を搭載するpRSlysEのメチロフィラス・メチロトロファスへの導入頻度は極めて低く、また機能を失わせるような変異が導入されたlysE変異遺伝子を持つプラスミドのみが導入できたことと併せて考えると、メチロフィラス・メチロトロファスにlysE遺伝子を導入することは致死的であると考えられた。これに対して、変異pRSlysEプラスミドライブラリーを導入した場合には、これよりはるかに多くのコロニーが出現することから、ヒドロキシルアミン処理による変異導入が高効率で行われたことを示している。

【0083】

上記のようにして変異lysEライブラリーを、変異pRSlysEプラスミドライブラリーとして得ることができた。そこでL-リジンを菌体外へ排出する活性を発現する機能型lysEを得るためのスクリーニング系を開発した。

【0084】

上記のようにして得られた変異pRSlysEプラスミドライブラリーを保持するメチロフィラス・メチロトロファスAS1株を、1プレートに数百個のコロニーが出現するように適当に希釈して、50mg/Lのストレプトマイシンおよび3g/LのL-スレオニンを含むSEII寒天培地に塗布し、37℃で48時間保温した。出現したコロニーを、L-スレオニンを3g/L、およびAECをそれぞれ0 g/L、5g/L、7g/L、10g/L含むSEII寒天培地にレプリカした。AECを含まないプレートにレプリカした場合では、もとのプレートにあったコロニー数とレプリカ後の複製プレートに出現するコロニーは同数であったが、AECを含むプレートにレプリカした場合は、もとのプレートより複製プレートに出現したコロニーの数は大幅に減少した。

AECをそれぞれの濃度で含む複製プレートで形成されたコロニーは、それぞれのプレートからAECを含む新しいSEII寒天培地に移して培養し、同培地上でシングルコロニーを形成できることで、AEC耐性を獲得していることを確認した。このような株の中から100株を無作為に選び出し、更なる選別に供した。

【0085】

(2) 変異pRSlysEプラスミドを導入した株によるL-アミノ酸生産

変異が導入され、AEC耐性を宿主に与えると思われた変異pRSlysEを持つメチロフィラス・メチロトロファスAS1株のうち100株を、50mg/Lのストレプトマイシンを含むSEIIプレートにそれぞれ塗り広げ、37℃にて1晩培養したのち、培地表面約10cm²の菌体をかきとって、50mg/Lのストレプトマイシンを含むSEII生産培地(20ml)に植菌し、37℃にて48時間振盪培養した。培養終了後、菌体を遠心分離により除去し、培養上清に含まれるL-アミノ酸を薄層クロマトグラフィーで分離し、ニンヒドリン検出をもちいた方法でおおよその定量を行った。その結果、様々な濃度のL-リジンおよびL-アルギニンを菌体外に排出していることがわかった。そのパターンから大まかにこの100株を5つのグループに分類した。

【0086】

これらの5つのグループの中から代表的な株をそれぞれ1株ずつ選び、それぞれの株が持つプラスミドをpRSlysE561、pRSlysE562、pRSlysE563、pRSlysE564、pRSlysE565と命名した。これらのプラスミドを精製し、lysE領域の塩基配列を解析した結果、pRSlysE562とpRSlysE563、およびpRSlysE561とpRSlysE564は全く同一の配列であることがわかった。そこで、以降は、pRSlysE562、pRSlysE564、pRSlysE565について調べた。

pRSlysE562、pRSlysE564、pRSlysE565のlysEタンパク質をコードする領域の塩基配列を解析した結果、lysE564では、配列番号1に示す野生型lysEのDNA配列における166位のG(グアニン)がA(アデニン)に置換していた。その結果、配列番号2に示す野生型lysEのアミノ酸配列における56位のGly(グリシン)がSer(セリン)に置換していた。lysE562では、配列番号1に示す野生型lysEのDNA配列における166位のG(グアニン)がA(アデニン)に、410位のA(アデニン)がG(グアニン)に置換していた。その結果、配列番号2に示

す野生型lysEのアミノ酸配列における56位のGly（グリシン）がSer（セリン）に、137位のAsp（アスパラギン酸）がGly（グリシン）にそれぞれ置換していた。lysE565では、配列番号1に示す野生型lysEのDNA配列における166位のG（グアニン）がA（アデニン）に、163位のG（グアニン）がA（アデニン）に置換していた。その結果、配列番号2に示す野生型lysEのアミノ酸配列における56位のGly（グリシン）がSer（セリン）に、55位のAla（アラニン）がThr（スレオニン）にそれぞれ置換していた。pRSlysE562、pRSlysE564、pRSlysE565をあらためてAS1株に導入したところ、pRSとほぼ同頻度でプラスミドが導入できた。プラスミド導入株について上記と同様の方法で培養を行い、培養上清に含まれるL-リジンおよびL-アルギニン濃度をアミノ酸分析計（日本分光製、高速液体クロマトグラフィー）で定量した。測定した結果を、表1に示す。

【0087】

【表1】

表1

菌株	L-リジン生産量(g/L)	L-アルギニン生産量 (g/L)
AS1/pRS	0.01	>0.010
AS1/pRSlysE562	0.19	0.210
AS1/pRSlysE564	0.20	0.240
AS1/pRSlysE565	0.13	0.150

【0088】

以上のことから、pRSlysE562、pRSlysE564、pRSlysE565は、L-リジンおよびL-アルギニンを有意に排出する活性を持つことがわかった。また、pRSlysE562、pRSlysE564、pRSlysE565をAS1株に再導入しても、L-リジンおよびL-アルギニンを排出する活性を保持していることから、AEC耐性を獲得した株の変異は宿主側に導入されたものではなく、プラスミド上の変異であることが明らかにさ

れた。

【0089】

pRSlysE562、pRSlysE564、pRSlysE565で共通に導入された変異は、配列番号2に示す野生型lysEのアミノ酸配列における56位のGly（グリシン）がSer（セリン）に置換するというものであった。この共通の変異のみを持つpRSlysE564で形質転換されたE. coli JM109株はAJ110086と命名され、同株は2002年9月26日に、独立行政法人 産業技術総合研究所 特許生物寄託センターに、受託番号FERM BP-8196としてブダペスト条約に基づき国際寄託されている。

【0090】

lysE562およびlysE565遺伝子は、lysE564より当業者によく知られた方法により容易に取得することができる。具体的には、pRSlysE564よりlysE564をコードする領域断片を、例えばPromega社の部位特異的変異導入用ベクターpSELECT™-1に組み込み、同社の部位特異変異導入キットAltered Sites™を用いて部位特異的変異を導入し、配列番号1の410位のA（アデニン）をG（グアニン）に置換してlysE562遺伝子を得ることができる。このとき、例えば配列番号5に示す合成オリゴヌクレオチドをプライマーに用いればよい。配列番号5の20番目の塩基は、野生型のlysE遺伝子において塩基置換される塩基である。同様にして、配列番号1に示す166位のG（グアニン）をA（アデニン）に置換することでlysE565遺伝子を得ることができる。変異導入には、例えば配列番号6に示す合成オリゴヌクレオチドを用いればよい。配列番号6の16番目及び19番目の塩基は、野生型のlysE遺伝子において塩基置換される塩基である。

【0091】

【実施例2】メチロフィラス・メチロトロファスへのL-リジン生合成系酵素遺伝子及び、lysE562、lysE564またはlysE565遺伝子の導入

lysE562、lysE564、lysE565遺伝子の導入により菌体外へのL-リジンの排出が促進されることがわかったので、lysE562、lysE564、lysE565遺伝子を導入した株においてL-リジン生合成系酵素の強化を行い、生産性の更なる向上を目指した。

【0092】

(1) dapA*遺伝子を持つプラスミドプラスミドpRSdapAの構築

L-リジン生合成系酵素遺伝子として、L-リジンによるフィードバック阻害を受けないジヒドロジピコリン酸合成酵素をコードする遺伝子 (dapA*) を持つプラスミドを作製した。

【0093】

実施例1で作製したpRStacをSse8387IおよびXbaIで消化し、フェノール・クロロホルム溶液を加えて混合し、反応を停止させた。反応液を遠心分離した後、上層を回収し、エタノール沈殿にてDNAを回収後、0.8%アガロースゲルで分離し、約9kbpのDNA断片を回収した。

【0094】

dapA*遺伝子断片は、同遺伝子を含む公知のプラスミドRSFD80(WO 95/16042号参照)を鋳型として、配列番号11および12に示すプライマーを用いたPCR法(変性94℃-20秒、アニーリング55℃-30秒、伸長反応72℃-60秒)により増幅した。PCR反応には、Pyrobest DNA polymerase(宝酒造社製)を使用した。得られたdapA*断片をPCRprep(Promega社製)にて精製した後、制限酵素Sse8387IおよびXbaIで消化した。フェノール・クロロホルム溶液を加えて混合し、反応を停止させた。反応液を遠心分離した後、上層を回収し、エタノール沈殿にてDNAを回収し、0.8%アガロースゲルで分離後、約0.1kbpのDNA断片を回収した。

【0095】

上記のように調製したpRStacベクター消化物と、dapA*遺伝子領域断片を、DNA Ligation Kit Ver.2(宝酒造製)を用いて連結させた。この連結反応溶液でエシェリヒア・コリ(E. coli JM109 competent cells、宝酒造社)を形質転換し、20mg/Lのストレプトマイシンを含むLB寒天培地に塗布し、37℃で一晩保温した。寒天培地上に出現したコロニーを、20mg/Lのストレプトマイシンを含むLB液体培地に接種し、37℃で8時間振盪培養した。アルカリ-SDS法にて各培養液からプラスミドDNAを抽出し、制限酵素での消化および塩基配列の決定により構造を確認して、pRSdapAプラスミドを得た。pRSdapAプラスミドは、tacプロモーターの転写方向に対して、dapA*遺伝子の転写方向が同じ向きになるように配置されている。

【0 0 9 6】

(2) dapA*遺伝子と、lysE562、lysE564又はlysE565遺伝子のいずれかの遺伝子を持つプラスミドの構築

lysE562、lysE564又はlysE565とdapA*との組み合わせ効果を評価するために、pRSlysE562、pRSlysE564、pRSlysE565プラスミドのそれぞれにdapA*遺伝子を挿入したプラスミドを構築した。実施例1で作製したpRSlysE562、lysE564、lysE565を制限酵素SapIで消化し、DNA Blunting Kit (宝酒造社製) にて末端を平滑化した。また、プラスミドpRSdapAを制限酵素EcoRIおよびSapIで消化し、0.8%アガロースゲルにより約1kbpのtacプロモーターおよびdapA*領域を含む断片を分離し、同断片をEASY TRAP Ver2(宝酒造製)にて回収した。この断片を前記と同様に平滑末端化し、前記のpRSlysE562、lysE564、lysE565の消化物のそれぞれと、DNA Ligation Kit Ver2(宝酒造製)にて連結した。

【0 0 9 7】

上記のそれぞれの連結反応溶液でエシェリヒア・コリ (E. coli JM109 competent cells、宝酒造社製) を形質転換し、20mg/Lのストレプトマイシンを含むLB寒天培地に塗布し、37℃で一晩保温した。寒天培地上に出現したコロニーを20mg/Lのストレプトマイシンを含むLB液体培地に接種し、37℃で8時間振盪培養した。アルカリー-SDS法にて各培養液からプラスミドDNAを抽出し、制限酵素での消化および塩基配列の決定により構造を確認して、pRSlysE562dapA、pRSlysE564dapA、pRSlysE565dapAプラスミドを得た。このプラスミドは、lysE562、lysE564、lysE565の各遺伝子とdapA*の転写の向きが逆向きになるように配置されている。

【0 0 9 8】

上記の方法で得られたpRSlysE562dapA、pRSlysE564dapA、pRSlysE565dapAプラスミドを、エレクトロポレーション法によりメチロフィラス・メチロトロファスAS1株 (NCIMB10515) に導入したところ、pRSlysE562dapA、pRSlysE564dapAは形質転換株が得られたが、pRSlysE565dapAは形質転換株が得られなかった。これは、プラスミドの安定性がAS1株中で低下してしまったことによるのかもしれない。

【0 0 9 9】

(3) lysE562又はlysE564、およびdapA^{*}を保持するメチロフィラス属細菌によるL-リジンの製造

前記のようにして得られたpRSlysE562dapA、pRSlysE564dapA又は対照としてpRSlysEdapAが導入されたAS1株を、20mg/Lのストレプトマイシンを含むSEIIプレートに塗り広げ、37℃にて1晩培養したのち、培地表面約0.3cm²の菌体をかきとって20mg/Lのストレプトマイシンを含むSEII生産培地(20ml)に植菌し、37℃にて34時間振盪培養した。培養終了後、菌体を遠心分離により除去し、培養上清に含まれるL-リジン濃度をアミノ酸分析計(日本分光製、高速液体クロマトグラフィー)で定量した。結果を表2に示す。pRSlysE562dapA、pRSlysE564dapAを導入した株は、培地中のL-リジン蓄積が向上し、pRSlysE562、pRSlysE564を単独で導入した場合と比較して、培地中のL-リジン蓄積が大幅に向上し、排出における律速が解除され、dapA^{*}遺伝子増強効果が相乗的に表れたことがわかる。

【0100】

【表2】

表2

菌株	L-リジンの生産量(g/L)
AS1/pRS	>0.10
AS1/pRSlysE562dapA	1.42
AS1/pRSlysE564dapA	1.40

【0101】

【実施例3】メチロバチラス・グリコゲネスへのlysE564遺伝子の導入とL-アミノ酸生産

(1) pRS-lysE564-Tcの作製

メチロバチラス属細菌で変異型lysEであるlysE562、lysE564、lysE565が機能することを確認することにした。そのために、lysE564を選び、lysE564発現用プラスミドpRSlysE564の改変を行った。pRSlysE564プラスミドはストレプトマイシ

ン耐性遺伝子を搭載しているが、メチロバチラス・グリコゲネスは本来、このストレプトマイシンに耐性であるため、pRSlysEプラスミドを選別することができない。そこで、メチロバチラス・グリコゲネスで使用可能なテトラサイクリン耐性遺伝子をpRSlysEプラスミドに挿入した改変プラスミドを構築した。

【0102】

まず、pRSlysE564より、テトラサイクリン耐性遺伝子を搭載するpRS-lysE564-Tcを構築した。pRS-lysE564プラスミドを制限酵素EcoRIで消化し、フェノール・クロロホルム溶液を加えて混合し、反応を停止させた。反応液を遠心分離した後、上層を回収し、エタノール沈殿にてDNAを回収後、DNA blunting kit（宝酒造社製）を用いて、切断末端を平滑化処理した。0.8%アガロースゲルにて分離し、約9キロベースペア（以下、「kbp」と記載）のDNA断片をEASY TRAP Ver.2（DNA回収キット、宝酒造社製）を用いて回収した。

【0103】

一方、テトラサイクリン耐性遺伝子領域を、pRK310プラスミド（J. Mol. Biol. (1994) 239:623-663 Werner Pansegrau, Erich Lanka, Peter T. Barth, David H. Figurski, Donald G. Guiney, Dieter Haas, Donald R. Helinski, Helmut Schwab, Vilma A. Stanisich and Christopher M. Thomas）を鋳型とし、配列番号13および14に示すプライマーを用いて、PCRにより増幅した（変性94℃-20秒、アニーリング55℃-30秒、伸長反応72℃-60秒のサイクルを30サイクル行った）。PCR反応にはPyrobest DNA polymerase（宝酒造社製）を使用した。増幅されたテトラサイクリン耐性遺伝子領域を含むDNA断片をPCRprep（Promega社製）にて精製した後、エタノール沈殿にてDNAを回収後、TaKaRa BKL kit（Blunting Kination Ligation Kit、宝酒造製）を用いて、末端の平滑化、およびリン酸化を行った後、フェノール・クロロホルム溶液を加えて混合し、反応を停止させた。反応液を遠心分離した後、上層を回収し、エタノール沈殿にてDNAを回収した後、0.8%アガロースゲルにて分離し、約1.5kbpのDNA断片をEASY TRAP Ver.2を用いて回収した。

尚、テトラサイクリン耐性遺伝子は、pRK310に代えて他のプラスミド、例えば、pRK2プラスミドを鋳型とし、上記と同様のPCR反応によっても、取得すること

ができる。

【0104】

上記のように調製したpRSlysE564ベクター断片と、テトラサイクリン耐性遺伝子領域を含むDNA断片を、DNA Ligation Kit Ver.2 (宝酒造製) を用いて連結させた。この連結反応溶液でエシェリヒア・コリ (E. coli JM109 competent cells、宝酒造製) を形質転換し、20mg/Lのストレプトマイシンおよび15mg/Lのテトラサイクリンを含むLB寒天培地に塗布し、37℃で一晩保温した。寒天培地上に出現したコロニーを、20mg/Lのストレプトマイシンおよび15mg/Lのテトラサイクリンを含むLB液体培地に接種し、37℃で8時間振盪培養した。アルカリ-SDS法にて各培養液からプラスミドDNAを抽出し、制限酵素で消化して構造を確認し、pRS-lysE564-Tcを得た。

【0105】

(2) メチロバチラス属細菌へのpRS-lysE564-Tcの導入とL-アミノ酸生産

上記のようにして得られたpRS-lysE564-Tcを、エレクトロポレーション法 (Canadian Journal of Microbiology, 43, 197 (1997)) によりメチロバチラス・グリコゲネス NCIMB11375株に導入した。なお、対照として、pRK310を同様にしてメチロバチラス・グリコゲネス NCIMB11375株に導入した。その結果、対照として用いたpRK310とほぼ同じ頻度でpRS-lysE564-Tcが導入されたコロニーが得られた。

【0106】

pRS-lysE564-Tcと同様な方法で、野生型lysEを搭載するpRSlysEプラスミドにテトラサイクリン耐性遺伝子領域を挿入したpRSlysETを構築し、同様の方法でメチロバチラス・グリコゲネス株に導入を試みたが、導入株は得られなかった。メチロフィラス・メチロトロファスAS1株で見られたのと同様の現象で、やはり、メチロバチラス属細菌においても野生型のlysEは正常に機能しないと考えられた。

【0107】

pRS-lysE564-Tcを持つメチロバチラス・グリコゲネス NCIMB11375株を、10mg/Lのテトラサイクリンを含むSEIIプレートに塗り広げ、30℃にて1晩培養した。

のち、培地表面約 10 cm^2 の菌体をかきとって 10 mg/L のテトラサイクリンを含む S EII 生産培地 (20 ml) に植菌し、 30°C にて 60 時間振盪培養した。培養終了後、菌体を遠心分離により除去し、培養上清に含まれる L-リジン濃度をアミノ酸分析計 (日本分光製、高速液体クロマトグラフィー) で定量した。その結果を、表 3 に示す。

【0108】

【表 3】

表 3

菌株	L-リジンの生産量 (g/L)
NCIMB11375/pRK310	0.10
NCIMB11375/pRS-lysE564-Tc	1.40

【0109】

(3) pRS-lysE564-dapA-Tc の作製

lysE564 遺伝子をメチロバチラス・グリコゲネス株に導入することによって、培地中に L-リジンが蓄積することがわかった。これは、L-リジンの排出が促進されたことによると考えられた。

そこで、実施例 2 と同様に、メチロバチラス・グリコゲネスにおいて、L-リジン生合成遺伝子と lysE564 遺伝子を組み合わせて増強した場合の効果を調べた。

【0110】

実施例 2 の (2) 項で作製した pRSlysE564dapA プラスミドに実施例 3 の (1) 項と全く同様の方法でテトラサイクリン耐性遺伝子を搭載したプラスミドを構築した。得られたプラスミドを pRS-lysE564-dapA-Tc と命名した。

(4) pRS-lysE564-dapA-Tc プラスミドのメチロバチラス・グリコゲネスへの導入と L-アミノ酸生産

【0111】

上記のようにして得られたpRS-lysE564-dapA-Tcを、エレクトロポレーション法によりメチロバチラス・グリコゲネス NCIMB11375株に導入した。得られた形質転換株（以下、「NCIMB11375/pRS-lysE564-dapA-Tc」ともいう）、前記のpRS-lysE564-Tcが導入されたメチロバチラス・グリコゲネス株（以下、「NCIMB11375/pRS-lysE564-Tc」ともいう）、および対象としてpRK310プラスミドを導入したメチロバチラス・グリコゲネス株（以下、「NCIMB11375/pRK310」ともいう）について、培養液上清中のL-アミノ酸濃度を調べた。

【0112】

各形質転換株を10mg/Lのテトラサイクリンを含むSEIIプレートで30℃にて2晩培養した後、培地表面約10cm²の菌体をかきとって10mg/Lのテトラサイクリンを含むSEII生産培地(20ml)に植菌し、30℃にて60時間振とう培養した。培養終了後、培養液の一部を用いて菌体を遠心分離によって除去し、培養上清に含まれるL-アミノ酸濃度をアミノ酸分析計で定量した。

【0113】

結果を表4に示した。NCIMB11375/pRS-lysE564-dapA-Tcでは、培地中に著量のL-リジンを蓄積した。NCIMB11375/pRS-lysE564-dapA-Tcを導入した株は、pRS1lysE564Tを単独で導入した場合と比較して、培地中のL-リジン蓄積が向上し、1lysE564遺伝子の導入により、排出における律速が解除され、dapA*遺伝子増強効果が相乗的に表れたと考えられる。

【0114】

【表4】

表4

菌株	培養上清中のL-リジン濃度	
	(g/L)	
NCIMB11375/pRK310	0.20	
NCIMB11375/pRS1lysE564T	1.40	
NCIMB11375/pRS-lysE564-dapA-Tc	1.62	

【0115】

〔配列表の説明〕

- 配列番号 1 : 野生型lysE塩基配列
配列番号 2 : 野生型LysEアミノ酸配列
配列番号 3 : 野生型dapA塩基配列
配列番号 4 : 野生型DDPSアミノ酸配列
配列番号 5、6 : lysE562部位特異的変異導入プライマー
配列番号 7、8 : tacプロモーター増幅用プライマー
配列番号 9、10 : lysEクローニング用プライマー
配列番号 11、12 : dapA*クローニング用プライマー
配列番号 13、14 : テトラサイクリン耐性遺伝子領域増幅用プライマー

【0116】

【発明の効果】

本発明により、メタノール資化性菌のL-アミノ酸生産性、特にL-リジン及びL-アルギニンの生産性を向上させることができる。

【0117】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Ajinomoto Co. Inc.

<120> Method for Producing L-Amino Acid Using Methyilotroph

<130> P-B0245

<140>

<141> 2002-11-20

<160> 14

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 711

<212> DNA

<213> Brevibacterium lactofermentum

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(711)

<400> 1

```

atg gtg atc atg gaa atc ttc att aca ggt ctg ctt ttg ggg gcc agt 48
Met Val Ile Met Glu Ile Phe Ile Thr Gly Leu Leu Leu Gly Ala Ser
  1           5           10          15
ctt tta ctg tcc atc gga ccg cag aat gta ctg gtg att aaa caa gga 96
Leu Leu Leu Ser Ile Gly Pro Gln Asn Val Leu Val Ile Lys Gln Gly
          20           25           30
att aag cgc gaa gga ctc att gcg gtt ctt ctc gtg tgt tta att tct 144
Ile Lys Arg Glu Gly Leu Ile Ala Val Leu Leu Val Cys Leu Ile Ser
          35           40           45
gac gtc ttt ttg ttc atc gcc ggc acc ttg ggc gtt gat ctt ttg tcc 192
Asp Val Phe Leu Phe Ile Ala Gly Thr Leu Gly Val Asp Leu Leu Ser
          50           55           60
aat gcc gcg ccg atc gtg ctc gat att atg cgc tgg ggt ggc atc gct 240
Asn Ala Ala Pro Ile Val Leu Asp Ile Met Arg Trp Gly Gly Ile Ala
        65           70           75           80

```

tac ctg tta tgg ttt gcc gtc atg gca gcg aaa gac gcc atg aca aac	288
Tyr Leu Leu Trp Phe Ala Val Met Ala Ala Lys Asp Ala Met Thr Asn	
85 90 95	
aag gtg gaa gcg cca cag atc att gaa gaa aca gaa cca acc gtg ccc	336
Lys Val Glu Ala Pro Gln Ile Ile Glu Glu Thr Glu Pro Thr Val Pro	
100 105 110	
gat gac acg cct ttg ggc ggt tcg gcg gtg gcc act gac acg cgc aac	384
Asp Asp Thr Pro Leu Gly Gly Ser Ala Val Ala Thr Asp Thr Arg Asn	
115 120 125	
cgg gtg cgg gtg gag gtg agc gtc gat aag cag cgg gtt tgg gta aag	432
Arg Val Arg Val Glu Val Ser Val Asp Lys Gln Arg Val Trp Val Lys	
130 135 140	
ccc atg ttg atg gca atc gtg ctg acc tgg ttg aac ccg aat gcg tat	480
Pro Met Leu Met Ala Ile Val Leu Thr Trp Leu Asn Pro Asn Ala Tyr	
145 150 155 160	
ttg gac gcg ttt gtg ttt atc ggc ggc gtc ggc gcg caa tac ggc gac	528
Leu Asp Ala Phe Val Phe Ile Gly Gly Val Gly Ala Gln Tyr Gly Asp	
165 170 175	
acc gga cgg tgg att ttc gcc gct ggc gcg ttc gcg gca agc ctg atc	576
Thr Gly Arg Trp Ile Phe Ala Ala Gly Ala Phe Ala Ala Ser Leu Ile	
180 185 190	
tgg ttc ccg ctg gtg ggt ttc ggc gca gca gca ttg tca cgc ccg ctg	624
Trp Phe Pro Leu Val Gly Phe Gly Ala Ala Ala Leu Ser Arg Pro Leu	
195 200 205	
tcc agc ccc aag gtg tgg cgc tgg atc aac gtc gtc gtg gca gtt gtg	672
Ser Ser Pro Lys Val Trp Arg Trp Ile Asn Val Val Val Ala Val Val	
210 215 220	
atg acc gca ttg gcc atc aaa ctg atg ttg atg ggt tag	711
Met Thr Ala Leu Ala Ile Lys Leu Met Leu Met Gly	

225

230

235

<210> 2

<211> 236

<212> PRT

<213> Brevibacterium lactofermentum

<400> 2

Met Val Ile Met Glu Ile Phe Ile Thr Gly Leu Leu Leu Gly Ala Ser

1

5

10

15

Leu Leu Leu Ser Ile Gly Pro Gln Asn Val Leu Val Ile Lys Gln Gly

20

25

30

Ile Lys Arg Glu Gly Leu Ile Ala Val Leu Leu Val Cys Leu Ile Ser

35

40

45

Asp Val Phe Leu Phe Ile Ala Gly Thr Leu Gly Val Asp Leu Leu Ser

50

55

60

Asn Ala Ala Pro Ile Val Leu Asp Ile Met Arg Trp Gly Gly Ile Ala

65

70

75

80

Tyr Leu Leu Trp Phe Ala Val Met Ala Ala Lys Asp Ala Met Thr Asn

85

90

95

Lys Val Glu Ala Pro Gln Ile Ile Glu Glu Thr Glu Pro Thr Val Pro

100

105

110

Asp Asp Thr Pro Leu Gly Gly Ser Ala Val Ala Thr Asp Thr Arg Asn

115

120

125

Arg Val Arg Val Glu Val Ser Val Asp Lys Gln Arg Val Trp Val Lys

130

135

140

Pro Met Leu Met Ala Ile Val Leu Thr Trp Leu Asn Pro Asn Ala Tyr

145

150

155

160

Leu Asp Ala Phe Val Phe Ile Gly Gly Val Gly Ala Gln Tyr Gly Asp

165	170	175
Thr Gly Arg Trp Ile Phe Ala Ala Gly Ala Phe Ala Ala Ser Leu Ile		
180	185	190
Trp Phe Pro Leu Val Gly Phe Gly Ala Ala Ala Leu Ser Arg Pro Leu		
195	200	205
Ser Ser Pro Lys Val Trp Arg Trp Ile Asn Val Val Val Ala Val Val		
210	215	220
Met Thr Ala Leu Ala Ile Lys Leu Met Leu Met Gly		
225	230	235

<210> 3

<211> 1197

<212> DNA

<213> Escherichia coli

<220>

<221> CDS

<222> (272)..(1153)

<400> 3

ccaggcgact gtcttcaata ttacagccgc aactactgac atgacgggtg atggtgttca 60
 caattccacg gcgatcggca cccaacgcag tgatcaccag ataatgtgtt gcgatgacag 120
 tgtcaaactg gttattcctt taagggtga gttgttcita aggaaagcat aaaaaaaca 180
 tgcatacaac aatcagaacg gttctgtctg cttgctttta atgccatacc aaacgtacca 240
 ttgagacact tgtttgcaca gaggatggcc c atg ttc acg gga agt att gtc 292

Met Phe Thr Gly Ser Ile Val

1

5

gcg att gtt act ccg atg gat gaa aaa ggt aat gtc tgt cgg gct agc 340
 Ala Ile Val Thr Pro Met Asp Glu Lys Gly Asn Val Cys Arg Ala Ser

10	15	20	
ttg aaa aaa ctg att gat tat cat gtc gcc agc ggt act tcg gcg atc	388		
Leu Lys Lys Leu Ile Asp Tyr His Val Ala Ser Gly Thr Ser Ala Ile			
25	30	35	
gtt tct gtt ggc acc act ggc gag tcc gct acc tta aat cat gac gaa	436		
Val Ser Val Gly Thr Thr Gly Glu Ser Ala Thr Leu Asn His Asp Glu			
40	45	50	55
cat gct gat gtg gtg atg atg acg ctg gat ctg gct gat ggg cgc att	484		
His Ala Asp Val Val Met Met Thr Leu Asp Leu Ala Asp Gly Arg Ile			
60	65	70	
ccg gta att gcc ggg acc ggc gct aac gct act gcg gaa gcc att agc	532		
Pro Val Ile Ala Gly Thr Gly Ala Asn Ala Thr Ala Glu Ala Ile Ser			
75	80	85	
ctg acg cag cgc ttc aat gac agt ggt atc gtc ggc tgc ctg acg gta	580		
Leu Thr Gln Arg Phe Asn Asp Ser Gly Ile Val Gly Cys Leu Thr Val			
90	95	100	
acc cct tac tac aat cgt ccg tcg caa gaa ggt ttg tat cag cat ttc	628		
Thr Pro Tyr Tyr Asn Arg Pro Ser Gln Glu Gly Leu Tyr Gln His Phe			
105	110	115	
aaa gcc atc gct gag cat act gac ctg ccg caa att ctg tat aat gtg	676		
Lys Ala Ile Ala Glu His Thr Asp Leu Pro Gln Ile Leu Tyr Asn Val			
120	125	130	135
ccg tcc cgt act ggc tgc gat ctg ctc ccg gaa acg gtg ggc cgt ctg	724		
Pro Ser Arg Thr Gly Cys Asp Leu Leu Pro Glu Thr Val Gly Arg Leu			
140	145	150	
gcg aaa gta aaa aat att atc gga atc aaa gag gca aca ggg aac tta	772		
Ala Lys Val Lys Asn Ile Ile Gly Ile Lys Glu Ala Thr Gly Asn Leu			
155	160	165	
acg cgt gta aac cag atc aaa gag ctg gtt tca gat gat ttt gtt ctg	820		

Thr Arg Val Asn Gln Ile Lys Glu Leu Val Ser Asp Asp Phe Val Leu
 170 175 180
 ctg agc ggc gat gat gcg agc gcg ctg gac ttc atg caa ttg ggc ggt 868
 Leu Ser Gly Asp Asp Ala Ser Ala Leu Asp Phe Met Gln Leu Gly Gly
 185 190 195
 cat ggg gtt att tcc gtt acg act aac gtc gca gcg cgt gat atg gcc 916
 His Gly Val Ile Ser Val Thr Thr Asn Val Ala Ala Arg Asp Met Ala
 200 205 210 215
 cag atg tgc aaa ctg gca gca gaa gaa cat ttt gcc gag gca cgc gtt 964
 Gln Met Cys Lys Leu Ala Ala Glu Glu His Phe Ala Glu Ala Arg Val
 220 225 230
 att aat cag cgt ctg atg cca tta cac aac aaa cta ttt gtc gaa ccc 1012
 Ile Asn Gln Arg Leu Met Pro Leu His Asn Lys Leu Phe Val Glu Pro
 235 240 245
 aat cca atc ccg gtg aaa tgg gca tgt aag gaa ctg ggt ctt gtg gcg 1060
 Asn Pro Ile Pro Val Lys Trp Ala Cys Lys Glu Leu Gly Leu Val Ala
 250 255 260
 acc gat acg ctg cgc ctg cca atg aca cca atc acc gac agt ggt cgt 1108
 Thr Asp Thr Leu Arg Leu Pro Met Thr Pro Ile Thr Asp Ser Gly Arg
 265 270 275
 gag acg gtc aga gcg gcg ctt aag cat gcc ggt ttg ctg taa agt 1153
 Glu Thr Val Arg Ala Ala Leu Lys His Ala Gly Leu Leu Ser
 280 285 290
 ttagggagat ttgatggctt actctgttca aaagtcgcgc ctgg 1197

<210> 4

<211> 292

<212> PRT

<213> Escherichia coli

<400> 4

Met Phe Thr Gly Ser Ile Val Ala Ile Val Thr Pro Met Asp Glu Lys
 1 5 10 15
 Gly Asn Val Cys Arg Ala Ser Leu Lys Lys Leu Ile Asp Tyr His Val
 20 25 30
 Ala Ser Gly Thr Ser Ala Ile Val Ser Val Gly Thr Thr Gly Glu Ser
 35 40 45
 Ala Thr Leu Asn His Asp Glu His Ala Asp Val Val Met Met Thr Leu
 50 55 60
 Asp Leu Ala Asp Gly Arg Ile Pro Val Ile Ala Gly Thr Gly Ala Asn
 65 70 75 80
 Ala Thr Ala Glu Ala Ile Ser Leu Thr Gln Arg Phe Asn Asp Ser Gly
 85 90 95
 Ile Val Gly Cys Leu Thr Val Thr Pro Tyr Tyr Asn Arg Pro Ser Gln
 100 105 110
 Glu Gly Leu Tyr Gln His Phe Lys Ala Ile Ala Glu His Thr Asp Leu
 115 120 125
 Pro Gln Ile Leu Tyr Asn Val Pro Ser Arg Thr Gly Cys Asp Leu Leu
 130 135 140
 Pro Glu Thr Val Gly Arg Leu Ala Lys Val Lys Asn Ile Ile Gly Ile
 145 150 155 160
 Lys Glu Ala Thr Gly Asn Leu Thr Arg Val Asn Gln Ile Lys Glu Leu
 165 170 175
 Val Ser Asp Asp Phe Val Leu Leu Ser Gly Asp Asp Ala Ser Ala Leu
 180 185 190
 Asp Phe Met Gln Leu Gly Gly His Gly Val Ile Ser Val Thr Thr Asn
 195 200 205
 Val Ala Ala Arg Asp Met Ala Gln Met Cys Lys Leu Ala Ala Glu Glu

210 215 220
His Phe Ala Glu Ala Arg Val Ile Asn Gln Arg Leu Met Pro Leu His
225 230 235 240
Asn Lys Leu Phe Val Glu Pro Asn Pro Ile Pro Val Lys Trp Ala Cys
245 250 255
Lys Glu Leu Gly Leu Val Ala Thr Asp Thr Leu Arg Leu Pro Met Thr
260 265 270
Pro Ile Thr Asp Ser Gly Arg Glu Thr Val Arg Ala Ala Leu Lys His
275 280 285
Ala Gly Leu Leu
290

<210> 5

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 5

cgggtggagg tgagcgtcgg taagcagcgg gtttgg

36

<210> 6

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 6

gtctttttgt tcatcaccag caccttgggc gtt 33

<210> 7

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 7

agggaattcc ccgttctgga taatgttttt tgcgccgac 39

<210> 8

<211> 58

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 8

cggatgcatc tagagttaac ctgcagggtg aaattgttat ccgctcaca ttccacac 58

<210> 9

<211> 64

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 9

catttcctgc aggcaaagga gatgagcgta atggtgatca tggaaatctt cattacaggt 60
ctgc 64

<210> 10

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 10

gggcgagcta gaagagctcc aaaacccgcg aaaactaacc catcaacatc 50

<210> 11

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 11

tgacctgcag gtttgcacag aggatggccc atgtt

35

<210> 12

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 12

cattctagat ccctaaactt tacagcaaac cggcat

36

<210> 13

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 13

gcacggatca ctgtattcgg ctgcaacttt

30

<210> 14

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 14

gccgtgttgc taggatggtt gttcttggat ca

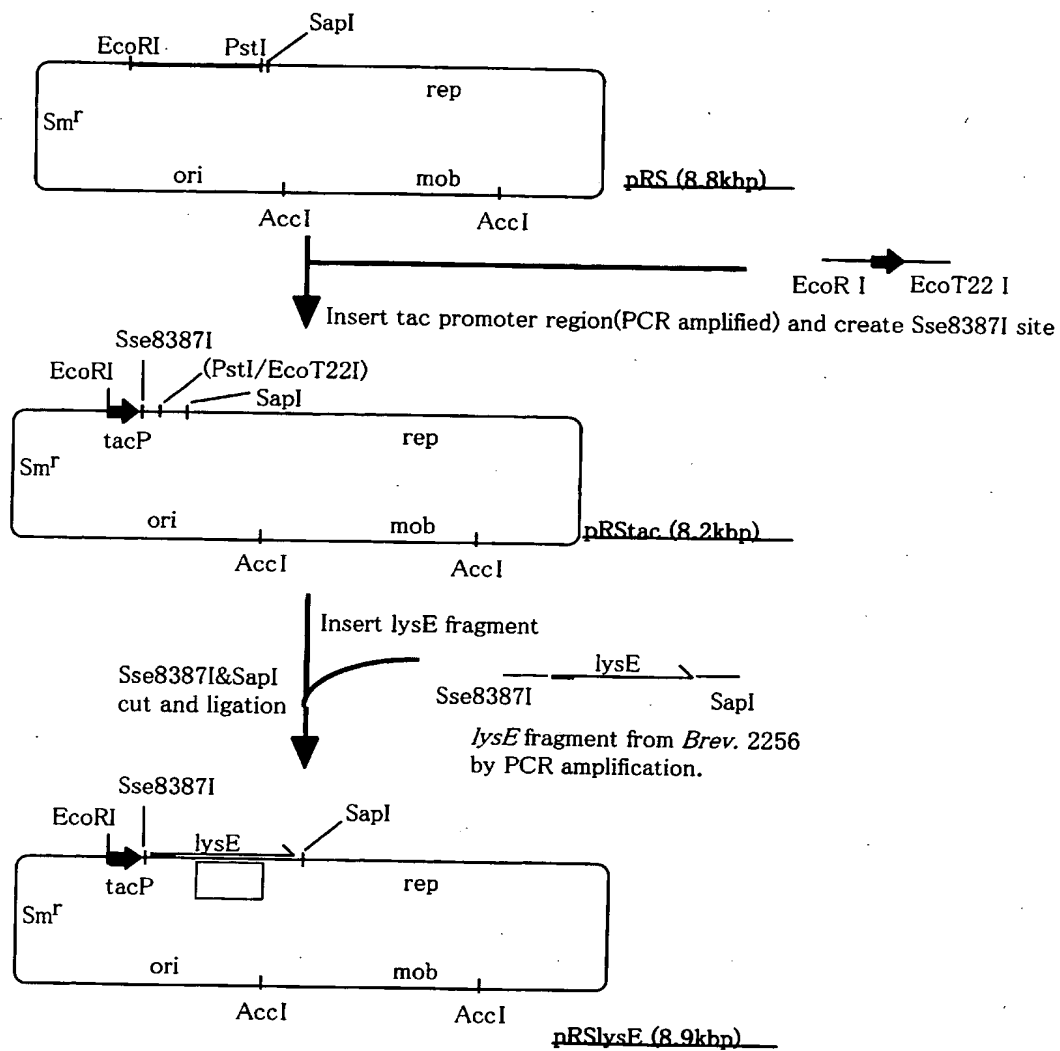
32

【図面の簡単な説明】

【図 1】 tacプロモーターを持つプラスミドpRStac、及びpRStacにlysE遺伝子が挿入されたプラスミドpRSlysEの構築を示す図。

【書類名】 図面

【図 1】



【書類名】 要約書**【要約】**

【課題】 メタノール資化性菌のL-リジン及びL-アルギニンの生産性を向上させる。

【解決手段】 コリネ型細菌のLysEタンパク質又はその相同タンパク質の変異体をコードするDNAであって、同変異体は、メタノール資化性菌に導入したときに、同細菌にL-リジンアナログに対する耐性を付与する活性を有するDNAを、メタノール資化性菌に導入する。

【選択図】 図1

特願 2002-336315

出願人履歴情報

識別番号

[000000066]

1. 変更年月日 1991年 7月 2日
[変更理由] 住所変更
 住 所 東京都中央区京橋1丁目15番1号
 氏 名 味の素株式会社

2. 変更年月日 2003年 5月12日
[変更理由] 名称変更
 住所変更
 住 所 東京都中央区京橋1丁目15番1号
 氏 名 味の素株式会社